

Biosensor Amperometri Untuk Deteksi Glukosa Berbasis Immobilisasi Glukosa Oksidase Dalam Membran Selulosa Asetat Dengan Ferrocene Sebagai Mediator

Amperometric biosensor for glucose detection based-on immobilisation of glucose oxidase in acetic cellulose membrane using ferrocene as mediator

Asnawati^{*)}, Dwi Indarti, Tri Mulyono, Gembong Kesuma B
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember

*)Email: asnawati08@yahoo.com

ABSTRACT

The study reported the development of glucose amperometric biosensor based on immobilization of glucose oxidase on cellulose acetate membrane with ferrocene as a mediator. Biosensor was designed with model Fc, GOx, CP / GOx / CA where ferrocene and the enzyme glucose oxidase on carbon paste in immobilization on the electrode body in the form of glass tubes and in other parts of the enzyme glucose oxidase in immobilization on cellulose acetate membrane with adsorption techniques are placed in electrode tip by using the o-ring. The presence of enzymes immobilization was determined quantitatively by enzyme immobilization was Km value. The results showed the composition of acetone-water in the optimum coagulation bath is 0:100% and 0.0008 g of Optimum ferrocene. Biosensor for measuring glucose in the area amperometri 0.1 to 3 mM with regression coefficient of 0.996, the detection limit of 0.01 mM, sensitivity of 0.989 $\mu\text{A} / \text{mM}$, the reproducibility of 0.07 to 0.3% and lifetime of 1 day.

Keywords : Biosensor; glucose oxidase ; acetic cellulose; Ferrocene: Amperometric; Glucose

PENDAHULUAN

Kadar glukosa yang tinggi dalam darah merupakan indikator seseorang sakit diabetes melitus. Hasil penelitian secara menyeluruh di dunia lebih dari 30 juta orang penderita diabetes melitus. Penentuan kandungan glukosa dalam darah adalah tes yang sangat diperlukan untuk diagnosis diabetes melitus. Disamping kontrol diabetes, alat yang sama memberikan janji yang besar untuk aplikasi penting lain yaitu monitoring bioproses analisis makanan. Berangkat dari fenomena di atas, penelitian yang mengarah kepada pengembangan sensor untuk penentuan glukosa masih sangat diperlukan. Dengan mengeksplorasi bahan-bahan baru sebagai material sensor akan memberikan perkembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang sensor.

Selulosa asetat merupakan ester organik turunan selulosa, secara luas digunakan sebagai *fibres*, plastik dan membran dalam beberapa industri (Jandura *et. al.*, 2000). Penggunaan utama dalam industri tekstil, film fotografi, filter cerutu (Pauly *et al.*, 1995), dalam industri makanan, dan juga membran

sebagai dialisis (Kiso *et. al.*, 1999). Valente *et al.*, 2005 memodifikasi polyanilin dan selulosa asetat sebagai membran untuk sodium dodesil sulfat, hasilnya menunjukkan transport SDS dan air tergantung densitas polimer dan kandungan PANi. Membran selulosa asetat yang mengandung ferrosen/naftion untuk biosensor fruktosa menghasilkan limit deteksi yang rendah dan sangat efisien untuk mengeliminasi interferensi asam askorbat (Tkac *et. al.*, 2001).

Kinerja biosensor amperometri dipengaruhi oleh aktivitas enzim, konsentrasi sampel, permeabilitas membran, jenis dan konsentrasi mediator, matrik dalam sampel. Modifikasi desain rangkaian elektroda kerja (enzym, membran, mediator) merupakan salah satu cara untuk memperbaiki kinerja sensor amperometri. Nakabayasyi *et al.*, 1998 menentukan hydrogen peroksida secara amperometri berdasarkan transfer electron antara HRP yang diimmobilisasikan pada film polimer 3-amino phenol (PAPO) dan ferrosen sebagai mediator dengan memodifikasi desain elektroda kerja dengan 3 macam model yang berbeda yaitu : Fc, HRP,CP/HRP/PAPO; Fc,CP/HRP/PAPO dan Fc,HRP/CP/PAPO.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sensor model Fc, HRP,CP/HRP/PAPO memberikan sensitivitas yang paling tinggi.

Penelitian ini mendisain model elektroda kerja seperti diatas untuk sensor glukosa dengan enzim glukosa oksidase yang diimmobilisasikan pada selulosa asetat dan ferrosen sebagai mediator (Fc,GOx,CP/GOx/CA) dengan harapan memiliki sensitivitas yang baik serta *lifetime* yang panjang untuk mendeteksi glukosa dalam darah. Sebagai acuan ditetapkan beberapa tujuan penelitian yaitu mengetahui: komposisi aseton-air dalam bak koagulasi untuk membran selulosa asetat optimum, jumlah optimum Fc, karakteristik biosensor glukosa serta kinerja biosensor Fc,GOx,CP/GOx/CA untuk mendeteksi kadar glukosa secara amperometri.

METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi peralatan gelas, neraca analitik OHAUS Pioneer, home made potensiostat DAQ PCI 622 NI, hot plate dan stirer magnetik, pH meter Jenway 3320 dan spektrofotometer 21 D.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi selulosa asetat (Brataco), dimetil ftalat ($\rho = 1,19$ g/mL), aseton ($\rho = 0,79$ g/mL), DMSO ($\rho = 1,11$ g/mL), Glukosa, nelson A, nelson B, arsenomolibdat, *ferrocene*, parafin cair, glukosa oksidase merk Sigma aldrich, grafit, sodium klorida, sodium hidroksida, akuademineralisasi dan gas nitrogen.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Membran Selulosa Asetat

Membran selulosa asetat dibuat dengan menggunakan metode inversi fasa, yang terdiri dari selulosa asetat, aseton-DMSO dan dimetil ftalat dengan koagulan campuran aseton-air. Selulosa asetat dengan berat 1,1 gram dilarutkan dalam 6,8 mL DMSO, 2,3 mL aseton ($\rho_{\text{aseton}} = 0,79$ g/mL) dan dimetil ftalat ($\rho_{\text{Dmp}} = 1,19$ gram/mL) sebanyak 0,5 mL kemudian diaduk dengan *stirer* sampai larutan homogen. Larutan dicetak dan bak koagulasi terdiri dari : aseton-air 0:100 %, 1:99 %, 3:97 %, 5:95 % dan pada setiap membran dilakukan uji permeabilitas. Uji permeabilitas dilakukan dengan melewatkan glukosa 0,01 M pada setiap membran yang ditempatkan pada sel

permeabilitas. Larutan glukosa yang telah melewati membran dianalisis konsentrasinya menggunakan metode Nelson-Somogyi dan membaca absorbansinya pada panjang gelombang 690 nm.

Pembuatan Biosensor Glukosa

Membran optimum yang diperoleh kemudian dipotong dengan ukuran 3 x 3 cm, ukuran ini disesuaikan dengan elektroda kerja. Membran selulosa asetat yang telah dipotong kemudian ditetesi dengan larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7 yang mengandung $2,5 \times 10^5$ unit/L glukosa oksidase kemudian didiamkan selama 24 jam di dalam lemari es. Serbuk grafit sebanyak 0,1 g dicampur dengan 1,2 mg GOx, *ferrocene* (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 mg), dan ditambahkan parafin cair hingga terbentuk pasta karbon yang tidak terlalu cair. Kemudian pasta karbon dimasukkan ke body elektroda (tabung kaca) dan dihubungkan dengan kawat tembaga. Membran selulosa asetat-GOx yang telah dibuat ditempelkan pada permukaan bawah body elektroda pasta karbon dan diikat menggunakan O-ring.

HASIL dan PEMBAHASAN

Permeabilitas Membran Selulosa Asetat

Permeabilitas membran merupakan kemampuan suatu membran dalam melewatkan suatu permeat atau analit. Penentuan permeabilitas membran dilakukan dengan menempatkan membran selulosa asetat diantara sel permeabilitas. Sel permeabilitas tersebut mempunyai dua tempat larutan yang akan diisi dengan larutan glukosa 0,01 M dan air. Sel didiamkan selama 1 jam agar terjadi difusi glukosa melewati membran, kemudian konsentrasi glukosa yang melewati membran ditentukan menggunakan metode Nelson-Somogyi pada panjang gelombang 690 nm.

Komposisi aseton-air dalam bak koagulasi yang optimum adalah komposisi aseton-air 0:100 % yang mampu melewatkan glukosa dengan prosentase berat sebesar 50 %. Komposisi aseton-air 0:100 % mampu melewatkan konsentrasi glukosa lebih besar dari komposisi aseton-air yang lain karena proses pepadatan membran yang terjadi karena interaksi pendesakan pelarut (aseton) dan non pelarut (air) berlangsung cepat atau terjadi proses *instantaneous demixing* yang menyebabkan terbentuknya pori membran yang lebih besar, tetapi dengan adanya komposisi

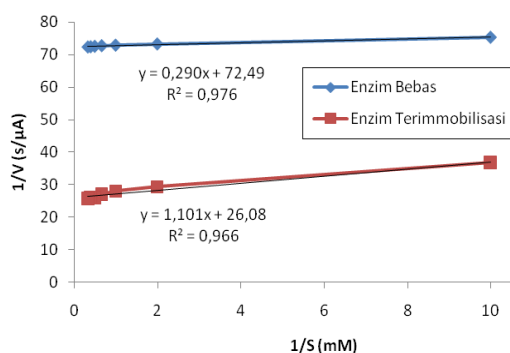
Tabel 1. Data konsentrasi glukosa yang melewati membran

Komposisi Aseton-air (%)	Glukosa yang Melewati Membran				
	Absorbansi Glukosa				Prosentase Berat (%)
	U1	U2	U3	Rata-rata	
0:100	0,256	0,25	0,247	0,251	50
1:99	0,162	0,16	0,160	0,161	32
3:97	0,157	0,159	0,197	0,171	34
5:95	0,219	0,225	0,177	0,207	41

lain yang ada dalam bak koagulasi yaitu aseton (komposisi aseton-air dalam bak koagulasi 1:99 %, 3:97 %, 5:95 %) maka proses pematatan sesaat atau *instantaneous demixing* tidak akan terjadi.

Aktivitas Enzim Glukosa Oksidase Bebas dan Terimmobilisasi

Perbedaan antara enzim bebas dan enzim terimmobilisasi terletak pada penempatan enzim, enzim bebas dilarutkan secara langsung pada larutan elektrolit sedangkan enzim terimmobilisasi dijebak dalam membran dengan cara adsorpsi serta dicampur di dalam pasta karbon. Aktifitas enzim bebas dan terimmobilisasi dapat ditentukan melalui nilai Km yang menyatakan affinitas enzim atau kecenderungan enzim untuk membentuk kompleks enzim-substrat.



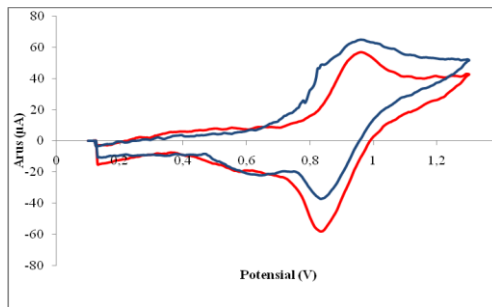
Gambar 2. Grafik Lineweaver-Burk pada Enzim Glukosa Oksidase Bebas dan Glukosa Oksidase Terimmobilisas

Berdasarkan perhitungan didapatkan nilai Km untuk enzim bebas sebesar 0,004001 mM sedangkan nilai Km untuk enzim terimmobilisasi sebesar 0,04221 mM.

Nilai Km enzim terimmobilisasi lebih besar dari pada nilai Km enzim bebas, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim terimmobilisasi lebih kecil dari pada enzim bebas. Nilai Km didapat dari persamaan $K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$, sehingga nilai Km akan berkebalikan dengan kecenderungan enzim membentuk kompleks enzim-substrat. Nilai Km yang terukur pada bentuk enzim terimmobilisasi menunjukkan bahwa ada enzim yang terimmobilisasi dalam biosensor meskipun terjadi pengurangan aktivitas dibandingkan dengan enzim bentuk bebas. Berdasarkan perhitungan didapatkan nilai Km untuk enzim bebas sebesar 0,004001 mM sedangkan nilai Km untuk enzim terimmobilisasi sebesar 0,04221 mM. Nilai Km enzim terimmobilisasi lebih besar dari pada nilai Km enzim bebas, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim terimmobilisasi lebih kecil dari pada enzim bebas. Nilai Km didapat dari persamaan $K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$, sehingga nilai Km akan berkebalikan dengan kecenderungan enzim membentuk kompleks enzim-substrat. Nilai Km yang terukur pada bentuk enzim terimmobilisasi menunjukkan bahwa ada enzim yang terimmobilisasi dalam biosensor meskipun terjadi pengurangan aktivitas dibandingkan dengan enzim bentuk bebas.

Potensial Oksidasi Optimum Ferrocene (Fc)
 Biosensor Fc, GOx, CP/GOx/CA menggunakan *ferrocene* sebagai mediator transfer elektron, disini *ferrocene* akan teroksidasi lebih dahulu menjadi ion

ferricinium (Fe^+) sebelum menangkap elektron dari hasil oksidasi glukosa oleh enzim GOx. Penentuan potensial oksidasi optimum *ferrocene* dilakukan menggunakan metode voltametri siklik dengan potensial 0,1-1,3 V, *scanrate* 5 mV/s dan 2 kali siklik.



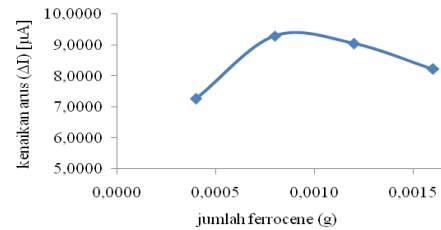
Gambar 3. Voltamogram Siklik Penentuan Potensial Oksidasi Optimum Fc 0,0012 g dengan Menggunakan Enzim GOx dan Membran CA dengan

Gambar 3. menampilkan voltamogram siklik berwarna biru dan merah, warna biru adalah arus dari glukosa sedangkan warna merah adalah arus dari NaCl. Pemberian potensial antara 0,1-1,3 V akan membuat *ferrocene* teroksidasi menjadi ion *ferricinium* (Fc^+). Pemberian potensial 0,773 V menyebabkan terjadinya kenaikan arus, hal ini disebabkan karena proses oksidasi *ferrocene* akan melepas elektron sehingga penambahan elektron dari proses ini akan terukur sebagai arus yang naik. Arus ini semakin bertambah hingga mencapai puncaknya di potensial 0,959 V. Nilai potensial ini disebut sebagai potensial oksidasi optimum, dimana *ferrocene* teroksidasi paling banyak.

Jumlah Optimum Ferrocene (Fc)

Optimasi jumlah *ferrocene* dilakukan untuk memperoleh jumlah *ferrocene* optimum pada biosensor Fc,GOx,CP/GOx/CA yang digunakan untuk pengukuran selanjutnya. Optimasi jumlah *ferrocene* dilakukan dengan potensial optimum 0,959 V dengan variasi 0,0004; 0,0008; 0,0012 dan 0,0016 g *ferrocene*.

Jumlah enzim GOx yang diimmobilisasi dan jumlah larutan glukosa yang digunakan pada optimasi jumlah *ferrocene* adalah sama, maka enzim akan mengoksidasi substrat dengan jumlah yang sama pula, sehingga jumlah elektron yang harus di transfer oleh *ferrocene* ke elektroda kerja juga sama besarnya.

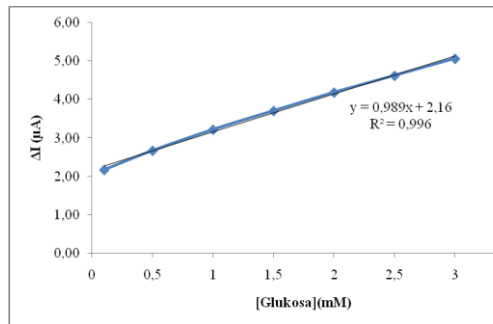


Gambar 4 Penentuan Jumlah Fc dengan 2 mM Glukosa, 0,5 M NaCl dalam 0,1 M Buffer Phospat pH 7, Potensial 0,959V vs Ag/AgCl dan *sweeprate* 5mV/s

Dari gambar 5 dapat terlihat kenaikan arus dari Fc 0,0004 g ke Fc 0,0008 g, hal ini menyatakan bahwa jumlah Fc 0,0004 g masih belum cukup untuk mentransfer semua elektron yang dihasilkan dari oksidasi glukosa oleh GOx ke elektroda kerja. Pada Fc 0,0008 g didapatkan kenaikan arus optimum sebesar 9,3 μA , hal ini menyatakan bahwa pada titik tersebut elektron dapat ditransfer secara keseluruhan ke elektroda kerja. Fc 0,0008 g adalah jumlah optimum *ferrocene* sehingga jumlah *ferrocene* di atasnya seharusnya mampu mentransfer seluruh elektron dari hasil oksidasi glukosa ke elektroda kerja, namun arus yang didapat dari Fc 0,0012 g dan 0,0016 g mengalami penurunan. Penurunan arus yang dihasilkan disebabkan semakin banyaknya jumlah *ferrocene* yang digunakan akan menghasilkan ion *ferricinium* yang banyak pula, sedangkan jumlah elektron yang dihasilkan dari reaksi oksidasi glukosa cenderung tetap sehingga akan terjadi persaingan antar ion *ferricinium* dalam mentransfer elektron, hambatan ini yang menyebabkan arus yang dibaca semakin kecil. Dari gambar 5. dapat disimpulkan bahwa Fc 0,0008 g adalah jumlah optimum *ferrocene* dan akan dipakai dalam pengukuran selanjutnya.

Karakteristik Biosensor Fc, GOx, CP/GOx/CA

Kemampuan dari biosensor Fc, GOx, CP/GOx/CA dalam mendeteksi glukosa dikarakteristik berdasarkan kelinieran kurva, limit deteksi, sensitivitas, reproduibilitas dan *lifetime* pada kondisi optimum biosensor.



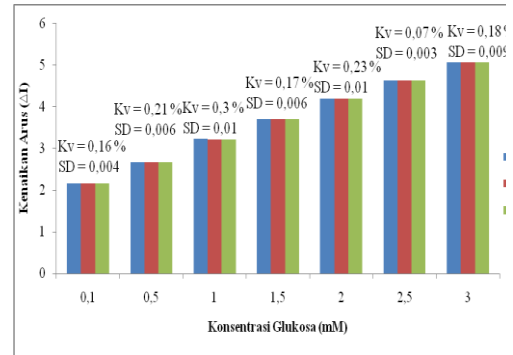
Gambar 5. Kurva Kalibrasi Biosensor Fc,GOx,CP/GOx/CA dilakukan dengan 0,0008 g Fc, 0,5 M NaCl dalam 0,1 M Buffer Fosfat pH 7, Potensial 0,959 V vs Ag/AgCl dan *sweep rate* 5 mV/s.

Berdasarkan gambar 6. diketahui bahwa arus meningkat sesuai dengan peningkatan konsentrasi glukosa. Hubungan linier ini menunjukkan bahwa konsentrasi sebanding dengan kenaikan arus yang terukur. Semakin tinggi konsentrasi glukosa maka semakin tinggi kenaikan arus yang dihasilkan karena glukosa yang dioksidasi oleh enzim GOx semakin banyak, dan elektron yang ditransfer selama pengukuran menjadi semakin besar, ditunjukkan dengan arus yang semakin tinggi. Koefisien regresi yang diperoleh. adalah sebesar 0,996, artinya ± 99,6 % perubahan arus dipengaruhi oleh perubahan konsentrasi glukosa, sedangkan ± 0,4 % dipengaruhi oleh faktor lain.

Limit deteksi suatu metode pengukuran adalah konsentrasi terkecil dari analit yang dapat diukur oleh alat dengan baik. semakin kecil konsentrasi yang bisa dideteksi maka semakin baik karakteristik sensor tersebut. berdasarkan kurva kalibrasi diperoleh limit deteksi pada 0,01 mM. konsentrasi terkecil yang bisa diukur oleh biosensor fc,gox,cp/gox/ca adalah 0,01 mM.

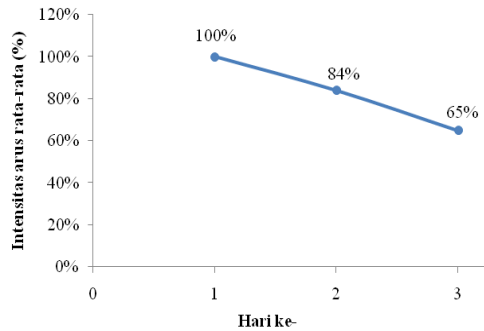
Sensitivitas biosensor Fc,GOx,CP/GOxCA ditentukan berdasarkan nilai *slope*/kemiringan dari kurva kalibrasi. Sensitivitas merupakan rasio perubahan sinyal tiap unit perubahan konsentrasi analit. Berdasarkan gambar 6. kurva kalibrasi biosensor Fc,GOx,CP/GOx/CA didapatkan nilai sensitivitas sebesar 0,989 µA/mM, nilai tersebut menyatakan bahwa dengan pemberian konsentrasi analit 2 mM, biosensor dapat menghasilkan arus sebesar 1,978 µA. Nilai sensitivitas yang semakin besar

menunjukkan semakin sensitif metode analisis tersebut.



Gambar 6. Penentuan Reprodusibilitas Biosensor Fc, GOx, CP/GOx/CA dilakukan dengan 0,0008 g Fc, 0,5 M NaCl dalam 0,1 M Buffer Fosfat pH 7, Potensial 0,959 V vs Ag/AgCl dan *sweep rate* 5 mV/s.

Reprodusibilitas merupakan kemampuan biosensor menghasilkan output yang sama ketika diberikan input yang tetap tanpa *mereset* ulang sistem. Reprodusibilitas yang dinyatakan dengan Kv (koevisien variasi) menunjukkan tingkat kesalahan pengukuran akibat pengulangan. Reprodusibilitas sensor dalam memberikan respon dikatakan baik apabila nilai koevisien variasinya (Kv) kurang dari 5 %. Gambar 7. menunjukkan reprodusibilitas pengukuran kenaikan arus rata-rata biosensor Fc,GOx,CP/GOx/CA. Nilai Kv terendah sebesar 0,07 % didapatkan pada saat pengukuran larutan glukosa 2,5 mM sedangkan Kv tertinggi sebesar 0,3 % didapatkan pada pengukuran larutan glukosa 1 mM. Nilai Kv sebesar 0,07 - 0,3 % mengindikasikan bahwa setiap 100 kali pengukuran terdapat 0,07 sampai 0,3 kali kesalahan.



Gambar 8. Penentuan *Lifetime* Biosensor Fc,GOx,CP/GOx/CA dilakukan dengan 0,0008 g Fc, 0,5 M NaCl dalam 0,1 M Buffer Phosphat pH 7, Potensial 0,959 V vs Ag/AgCl dan *sweep rate* 5 mV/s.

Penentuan *lifetime* biosensor Fc,GOx,CP/GOx/CA dilakukan dengan potensial optimum 0,959 V dan jumlah Fc optimum 0,0008 g. Pengukuran dilakukan satu kali setiap hari dengan menggunakan elektroda yang sama. Biosensor Fc,GOx,CP/GOx,CA bila tidak digunakan akan disimpan dalam buffer phosphate pH 7 dengan temperatur 4 °C. Berdasarkan gambar 8. penentuan *lifetime* biosensor Fc,GOx,CP/GOx/CA dapat diketahui bahwa pada hari ke 2 dan ke 3 biosensor mengalami penurunan respon arus glukosa lebih dari 5 % dibandingkan dengan hari pertama, sehingga dapat disimpulkan bahwa *lifetime* biosensor Fc,GOx,CP/GOx/CA adalah 1 hari.

KESIMPULAN

Komposisi aseton-air dalam bak koagulasi untuk membran selulosa asetat agar bekerja optimum adalah 0:100 %. Jumlah *ferrocene* optimum yang digunakan biosensor Fc,GOx,CP/GOx/CA adalah 0,0008 g. Hasil karakterisasi biosensor Fc,GOx,CP/GOx/CA terhadap glukosa: koefisien regresi sebesar 0,996 dengan *linier range* 0,1-3 mM; limit deteksi sebesar 0,01 mM; sensitivitas sebesar 0,989 $\mu\text{A}/\text{mM}$; reproduksibilitas sebesar 0,07-0,3 %; *lifetime* 1 hari.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada DP2M, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, yang telah membiayai penelitian Hibah Bersaing ini tahun 2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Bajpai RN. 1989. *Histologi Dasar*. Edisi 4. Jakarta. PT Binarupa Aksara.
- Bearden HJ. John WF. & Scott TW. 2004. *Applied Animal Reproduction*. Sixth Edition. New Jersey: Pearson Prentice Hall.
- Bivens CLM. & Olster HO. 1997. Abnormal Estrous Cyclicity and Behavioral Hyporesponsiveness to Ovarian Hormones in Genetically Obese Zucker Female Rats. *Endocrinology* **138** (1): 143-148
- Chang AS. Dale AN. & Moley KH. 2005. Maternal Diabetes Adversely Affects Preovulatory Oocyte Maturation, Development and Granulosa Cell Apoptosis. *Endocrinology* **146**(5): 2445-2453.
- Colton SA. Humpherson PG. Leese HJ. & Downs SM. 2003. Physiological Changes in Oocyte-cumulus Cell Complexes from Diabetic Mice that Potentially Influence Meiotic Regulation. *Biology of Reproduction* **69**:761-770.
- Cox NM. Meurer KA. Carlton CA. Tubbs RC & Mannis DP. 1994. Effect of Diabetes Mellitus during the Luteal Phase of Oestrous Cycle on Preovulatory Follicular Function, Ovulation and Gonadotrophins in Gilts. *Journal of Reproduction and Fertility* **101**:77-86
- Garris DR. Williams SK. Smith-West C. & West L. 1984. Diabetes-Associated Endometrial Disruption in The Chinese Hamster: Structure Changes in Relation to Progressive Hyperglycemia. *Experimental Biology and Medicine* **17**(6): 293-300.
- Garris DR & Garris BL. 2003. Diabetes-induced. Progressive Endometrial Involution Characterization of Periluminal Epithelial Lipoanathrophy. *Experimental Biology and Medicine* **52**(1):51-58.
- Gaspersz V. 1994. *Metode Perancangan Percobaan Untuk Ilmu-ilmu Pertanian, Ilmu-ilmu Teknik, Biologi*. Bandung: Armico.
- Granot I. & Dekel N. 1998. Cell-to-Cell Communication in The Ovarian Follicle: Development and Hormonal Regulation of The Expression of Connexin 43. *Human Reproduction* **13** Suppl:4. European Society for Human Reproduction and Embryology.
- Handari SS. 1983. *Metode Pewarnaan*. Jakarta: Bhatara Karya Aksara.
- Jesionowska H. Karelus K. & Nelson JF. 1990. Effects of Chronic Exposure to Estradiol on Ovarian Cyclicity in C57BL/6J Mice: Potention at Low Doses and Only Partial Suppression at High Doses. *Biology of Reproduction* **43**:312-317.
- Johnson M. 1998. *Diabetes; Terapi dan Pencegahannya*. Jawa Barat: Indonesia Publishing House Anggota IKAPI.
- Junqueira LC. & Carneiro J. 1998. *Histologi Dasar*. Edisi 3. Terjemahan Adji Dharma dari *Basic*

- Histology*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Krysko DV, Mussche S, Leybaert L, & D'Herde K. 2004. Gap junctional Communication and Connexin43 Expression in Relation to Apoptotic Cell Death and Survival of Granulosa Cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **52**(90):1199-1207.
- Lumbantobing SM. 2003. *Stroke Bencana Peredaran Darah di Otak*. Jakarta: Balai penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Malole MBM & CSU Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan Di Laboratorium*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Nurdiana PN, Setyawati & Ali M. 1998. Efek Streptozotocin Sebagai Bahan Diabetogenik Pada Tikus Wistar Dengan Cara Pemberian Intraperitoneal Dan Intravena. *Majalah Kedokteran Unibraw XIV* (2): 66-73.
- Ranakusuma AB. 1997. *Koma Hiperosmolar Hiperqlikemik Non Ketotik*. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I. Edisi 3. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC, & Cahili AFJr. 1977. Studies of Streptozotocin-induced Insulinitis and Diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **74**(6):2485-2489.
- Second Annual Report on Carcinogens. 2004. *Streptozotocin*. www.medicine.uiowa.edu/frfb/education, diakses pada tanggal 6 oktober 2004.
- Soeharto I. 2001. *Pencegahan dan Penyembuhan Penyakit Jantung Koroner Panduan Bagi Masyarakat Umum*. Jakarta: Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama.
- Utami P. 2003. *Tanaman Obat untuk Mengatasi Diabetes Meliltus*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Wikipedia 2005. *Gula Darah*. [http: wikipedia.org/Gula-darah](http://wikipedia.org/Gula-darah) [20 Desember 2005].